

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-031489

(43)Date of publication of application : 03.02.1995

(51)Int.CI. C12P 7/62

(21)Application number : 05-196671 (71)Applicant : ASAHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 15.07.1993 (72)Inventor : YOKOYAMA MASAKO

(54) SEPARATION OF BIO-POLYESTER FROM BIO-POLYESTER-CONTAINING MICROORGANISM

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a method for efficiently separating a bio-polyester in a granular state from microbial cells containing the bio-polyester.

CONSTITUTION: This method for separating the granular bio-polyester comprises adding an alkali in an amount of 1mmol-1mol/kg microbial cells to the aqueous suspension of bio-polyester-containing microorganisms, charging the suspension into a pressure-resistant container or preliminarily heating the suspension at 40-100° C and then charging the heated suspension into the pressure-resistant container, and subsequently heating and retaining the charged suspension at 40-100° C for raising the pressure to spout the suspension from the small opening of the container, thus allowing the shearing force of the fluid to act on the microorganism.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 11.05.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 09.12.2003

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-31489

(43) 公開日 平成7年(1995)2月3日

(51) Int.Cl.⁶
C 12 P 7/62

識別記号 庁内整理番号
7/62 7432-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数2 FD (全4頁)

(21) 出願番号 (22) 出願日	特願平5-196671 平成5年(1993)7月15日	(71) 出願人 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号 (72) 発明者 横山 雅子 岡山県倉敷市潮通3丁目13番1 旭化成工 業株式会社内 (74) 代理人 弁理士 清水 猛 (外2名)
-----------------------	--------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

(54) 【発明の名称】 バイオポリエステル含有微生物からのバイオポリエステルの分離方法

(57) 【要約】

【目的】 バイオポリエステル含有微生物から、バイオポリエステルを効率よく顆粒状で分離する方法を提供する。

【構成】 バイオポリエステル含有微生物の水性懸濁液に $1 \text{ mmol}/\text{kg}$ 菌体～ $1 \text{ mol}/\text{kg}$ 菌体の量のアルカリを添加した後、該懸濁液を耐圧性容器に導入し、もしくは予め該懸濁液を $40 \sim 100^\circ\text{C}$ に加熱して耐圧性容器に導入し、 $40 \sim 100^\circ\text{C}$ に加熱、保温して高圧をかけ、該容器の微小開口部から懸濁液を噴出させることにより微生物に流体剪断力を作用させ、顆粒状のバイオポリエステルを分離する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】バイオポリエステル含有微生物の水性懸濁液に $1\text{ mmol}/\text{kg}$ 菌体～ $1\text{ mol}/\text{kg}$ 菌体の量のアルカリを添加した後、該懸濁液を耐圧性容器に導入し、 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ～ $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ の範囲内で加熱、保温し、該懸濁液に高圧をかけ、該容器の微小開口部から該懸濁液を噴出させることによって微生物に液体剪断力を作用させ、顆粒状のバイオポリエステルを分離することを特徴とするバイオポリエステル含有微生物からのバイオポリエステルの分離方法。

【請求項2】耐圧性容器に導入する前に予め水性懸濁液を $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ～ $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ の範囲に加熱する請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、生分解性を有するバイオポリエステルの菌体からの分離方法に関する。

【0002】

【従来の技術】現在、プラスチック廃棄物は焼却、埋立などによって処理されているが、これらの処理方法には、それぞれ地球の温暖化、埋め立て地の地盤強度等の問題がある。そのため、プラスチックリサイクルへの社会意識の高まりとともに、リサイクルシステム化が進みつつある。しかし、リサイクル可能な用途には限りがあり、実際問題としてプラスチック廃棄物処理方法としては、焼却、埋立、リサイクルだけでは対応しきれず、自然環境中に放置されたままになるものも多い。そこで、廃棄後は自然界の物質循環に取り込まれ、分解生成物が有害物質とならないような生分解性プラスチックが注目されており、その開発が進められている。このようなプラスチックとして、特に、微生物が菌体内で生成するポリエステルは、自然界の炭素循環プロセスに組み込まれて生態系の安定化がなされると予想されている。また、医療分野においても、回収不要のインプラント材料、薬物担体としての利用が可能である。

【0003】しかし、このポリエステルをプラスチックとして使用するためには、微生物の菌体内から分離して取り出す必要がある。バイオポリエステル含有微生物からバイオポリエステルを得る方法として、クロロホルムをはじめとする有機溶媒による抽出法、次亜塩素酸ソーダ(Williamson, D. H., and Wilkinson, J. F. (1958). *J. Gen. Microbiol.* 19, 198-203.)またはリゾチームを用いて菌体を溶解し、残存したポリマーを顆粒として回収する方法が知られている。その他、リゾチーム以外の特定の酵素による菌体の溶解によってポリマーを回収する方法(特開昭60-145097)、 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超の高圧の水蒸気等の圧力の開放により菌体を破壊し、菌体破片屑とポリマーとに分離する方法(特開昭57-174094)等もある。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかし、クロロホルム等による溶媒抽出法は、当該抽出溶媒だけでなく、再沈殿のための貧溶媒も大量に必要とする。したがって、溶媒を各々再利用しようとすれば、2種の溶媒を分離することが必要である。さらに、一般に溶媒抽出に先立って菌体全体を完全に乾燥することが必要なため、多大の熱エネルギーを要することにもなるので、バイオポリエステルを工業的に生産するためには、多くのプロセス用設備やエネルギーが必要となり、事実上不利である。次亜塩素酸ソーダで処理した場合は、溶媒抽出法の欠点を回避することはできるが、一方、ポリエステルの分子量低下が起り(J. A. Ramsay, E. Berger, B. A. Ramsay and C. Chavarie (1990). *J. Biotechnology Techniques* 4, 4, 221-226)、ポリマーの品質に問題が生じる。リゾチームのような酵素は、少量の実験的利用には効果的であるが、大量に確保するのが困難なため、バイオポリエステルの量産には適切でない。特開昭60-145097の酵素法では、酵素処理前後の操作が多段階になり、量産のためには、なお改善の余地が大きい。特開昭57-174094の圧力の解放による方法は、得られたポリエステルの純度や収量が未記載のため、効果が不明である。本発明は、有機溶媒を用いないで、水性媒体中で $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 未満で剪断力をかけることにより、バイオポリエステルを含む微生物からバイオポリエステルを分離する方法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、バイオポリエステル含有微生物の水性懸濁液に $1\text{ mmol}/\text{kg}$ 菌体～ $1\text{ mol}/\text{kg}$ 菌体、好ましくは $2\text{ }.\text{ }5\text{ mmol}/\text{kg}$ 菌体～ $200\text{ mmol}/\text{kg}$ 菌体、特に好ましくは 50 mmol ～ $200\text{ mmol}/\text{kg}$ 菌体の量のアルカリを添加し、該懸濁液を耐圧性容器に導入し、もしくは予め該懸濁液を $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ～ $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ の範囲に加熱して耐圧性容器に導入し、 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ～ $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ の範囲内で加熱、保温し、該懸濁液を噴出させることによって微生物に流体剪断力を作用させ、顆粒状のバイオポリエステルを分離することを特徴とするバイオポリエステル含有微生物からのバイオポリエステルの分離方法に関する。なお、特開昭57-174094の方法では、同じく高圧を用いているが、これが、高圧を急激に低圧化した際の圧力ショックで菌体を破壊するのに対し、本発明は、高圧液体の微小口噴射時の剪断力によって、菌体破壊とバイオポリエステルの分離を促進する方法である。

【0006】本発明に用いる微生物は、細胞内にバイオポリエステルを蓄積しているバクテリア(細菌)である。例えば、アルカリゲネス属(*Alcaligenes*)の菌、*A. lipolytica* AK201(特開平5-64592)、*A. eutrophus*、*A.*

*latus*等、シュウドモナス属 (*Pseudomonas*)、バシルス属 (*Bacillus*)、アゾトバクター属 (*Azotobacter*)、ノカルディア属 (*Nocardia*) 等の菌株が示されるが、その種類に限定されるものではない。ここで、バイオポリエステルとは、ポリ-D-3-ヒドロキシブチレート〔以下、P (3HB) と略称する〕をはじめとするポリヒドロキシアルカノエート〔以下、P (HA) と略称する〕と称される微生物産生ポリエステルを指す。P (3HB) 以外の代表的な例として、3HBとD-3-ヒドロキシバレート (3HV)との共重合体〔P. A. Holmes et al (ICI), Eur. Pat. App. 1, 0052459 (1981)〕、3HBと4-ヒドロキシブチレート (4HB)との共重合体〔Y. Doi et al., Macromolecules, 21, 2722 (1988)〕が挙げられる。細胞内に蓄積しているバイオポリエステルは、微小な顆粒として存在することが知られている。

【0007】処理される細胞内のバイオポリエステル含有率 (以下、ポリマー含有率という) は、高いほうが好ましい。一般に、乾燥菌体としてポリマー含有率が20重量%以上がよい。アルカリ添加量、処理時間、分離操作の効率、分離ポリマーの純度等を考慮すると、50重量%以上のポリマー含有率が特に好ましい。水性懸濁液とは、培養終了後の培養懸濁液そのもの、または培養液から遠心等で分離した菌体を水に懸濁させたものを指す。菌体の懸濁濃度は、乾燥菌体換算で150g/1以下、好ましくは100g/1以下である。使用するアルカリとしては、NaOHを始めとしてLiOH、KOH等を含めたアルカリ金属の水酸化物、あるいはNH₃、OHが用いられる。アルカリの使用量は1mmol/kg菌体～1mol/kg菌体、好ましくは2.5mmol/kg菌体～200mmol/kg菌体、特に好ましくは50mmol/kg菌体～200mmol/kg菌体で、これを微生物の水性懸濁液に添加する。

【0008】本発明の方法では、アルカリを添加後は、水性懸濁液は、微小開口部を有する耐圧性容器に導入され、高圧をかけられる。このようにして開口部から押し出される菌体には、大きな剪断力が働くため、菌体は破壊され、バイオポリエステルの分離が促進されると推定される。このような耐圧性容器と加圧機構からなる装置は、循環装置付高圧ホモジナイザーによって代表される。したがって、本発明のバイオポリエステル分離法は、高圧ホモジナイザーの利用によって実施可能となる。高圧ホモジナイザーの温度設定は40～100°C、好ましくは60～100°Cにする。該懸濁液の加熱は、高圧ホモジナイザーの導入前に、設定温度に加熱しておくことも望ましい。高圧ホモジナイザー内に導入した該懸濁液にかける圧力は、装置によるが、500～1500kgf/cm²で作用させるのが好ましい。

【0009】循環装置付高圧ホモジナイザーとしては、マントンゴーリン (独国APV・ゴーリン社製)、ミニラボ (デンマーク APVラニー社製)、ブランリューベ連続式細胞破碎機 (独国Bran+Luebbe社製)、マイクロフルイダイザー (米国Microfluidics社製) 等を用いることができる。これらの装置は、一般的に液体を加圧することによって、乳化・分散・細胞破碎等に用いられることがよく知られている。本発明では、高圧ホモジナイザー内での加熱が必須なので、類似の高圧ホモジナイザーの一種であるが非加熱型であるフレンチプレスは、本発明に不適当である。フレンチプレスを用いて微生物中のバイオポリエステルを分離することは知られているが (Helmut Brändl et al., Advances in Bioc hemical Engineering, Biotechnology (1990), 41, 77-93.)、本発明の技術的特徴であるアルカリ添加や、加熱による分離の協同効果を実現した例は知られていない。

【0010】以上の処理操作により、短時間で効率よく菌体壁を破壊し、バイオポリエステルを顆粒状で菌体から分離できる。菌体壁が破壊されると、核酸のような水溶性の高分子物質が細胞外に溶出するために、該懸濁液の粘度は一旦上昇するが、剪断力によって核酸分子の切断も起こるためか、該懸濁液の粘度が再び低下し、その後の遠心操作、ろ過操作等でのバイオポリエステルの分離が容易に行える。処理前の該懸濁液の菌体濃度は、乾燥菌体換算で150g菌体/1まで処理可能であるため、通常培養後の菌体濃度を薄める必要がない。本発明により、短時間で効率よく菌体壁が破壊され、バイオポリエステルを顆粒状で分離できる。

【0011】
【実施例】本実施例で用いた微生物は、アルカリゲネス属に属する微生物アルカリゲネス・リポリティカ (*A caligenes lipolytica*) AK201 (特開平5-64592) で、培養後、P (3HB) を約50wt%含有している菌を遠心 (8000 rpm, 10 min, 遠心分離機はKUBOTA製6810 使用) によって培養液から分離後、ペースト状菌体に水を加えて40g菌体/1の水性懸濁液とした。この水性懸濁液を用いて、以下に示す実施例1、2および比較例1～4を行った。

【0012】実施例1、2および比較例1～4の操作で得たP (3HB) は、純度を調べるためにガスクロマトグラフィー、分子量分布の決定にゲルバーミエーションクロマトグラフィー (GPC) を用いて分析を行った。なお、ガスクロマトグラフィーには、実施例1、2および比較例1～4で得られた沈殿物を乾燥 (105°C, 24 hr) した後、メタノール/硫酸 (85/15 wt %/wt %) によりメタノリシスして菌体内ポリエステ

ルをモノマーのメチルエステルとしたものを分析して、ポリマー含有率を求めた。これは、〔H. Brandl et al, Int. J. Biol. Macromol. 1, 11, 49-55 (1989)〕に示される方法に従った。GPCには、試料(約100mg)中のポリエステルを熱クロロホルム150mlで抽出後、溶液を濃縮してヘキサンを加えて再沈し、沈殿をfiltration、真空乾燥(2hr)して10mg/10mlのクロロホルム溶液にして測定した。

【0013】(実施例1) 4.0mMとなるように0.1MのNaOH水溶液を加え、P(3HB)含有菌体の該懸濁液500mlを作成した。予め該懸濁液を90°Cで約5分間加熱後、APV・ゴーリン社製マントンゴーリンに投入する。この装置内で、該懸濁液をゲージ圧約1000kgf/cm²に加圧し(このとき、装置内の温度は予備加熱された懸濁液の温度に制御する)、瞬時(約10⁻⁶~10⁻⁵秒)に約0.02mmの隙間を通過させて空気中に放し、流体剪断力をかけた。この操作*

*を、懸濁液を自動的に循環させることにより5回繰り返した。処理後の懸濁液を遠心分離(2700rpm, 10min)して沈殿物を得た。

(実施例2) 該懸濁液を70°C、約5分間予備加熱すること、およびマントンゴーリン内の加熱温度を70°Cとする以外は、実施例1と同様に操作した。

【0014】(比較例1) 本例では、該懸濁液にNaOH水溶液を加えないこと以外は、実施例1と同様に操作した。

【0015】(比較例2) 本例では、該懸濁液にNaOH水溶液を加えないこと以外は、実施例1と同様に操作した。

(比較例3) 本例では、該懸濁液を加熱しないこと以外は、実施例1と同様に操作した。

実施例1、2および比較例1~4の分離条件を表1に示す。

【0016】

【表1】

	アルカリ量	予備加熱温度	マントンゴーリンの使用
実施例1	4.0mM	90°C (5min)	有(5回)
実施例2	4.0mM	70°C (5min)	有(5回)
比較例1	無	90°C (5min)	有(5回)
比較例2	無	70°C (5min)	有(5回)
比較例3	4.0mM	室温	有(5回)

実施例、比較例のガスクロマトグラフィー、GPCで得られた結果を表2に示した。

※ 【表2】

	ポリマー純度	M _n	M _w	M _w /M _n
実施例1	77.0%	1.20*10 ⁵	3.48*10 ⁵	2.91
実施例2	85.4%	3.14*10 ⁵	4.86*10 ⁵	1.55
比較例1	63.4%	2.10*10 ⁵	4.15*10 ⁵	1.98
比較例2	59.0%	2.04*10 ⁵	3.84*10 ⁵	1.88
比較例3	65.3%	2.63*10 ⁵	4.35*10 ⁵	1.66

【0017】

【発明の効果】本発明により、従来の各方法の欠点を克服した新しい分離方法を開発した。すなわち、有機溶媒を用いないで、水性媒体中に少量のアルカリを添加し、

100°C未満の加熱下で高圧ホモジナイザーを作動して菌体に剪断力をかけることにより、バイオポリエステルを含む微生物からバイオポリエステルを分離できた。